

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Differenzierung von Wachstum und Vermehrung an synchronisierten Hefezellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Klaus Stosseck

aus Marburg/Lahn

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Differenzierung von Wachstum und Vermehrung an synchronisierten Hefezellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Klaus Stosseck
aus Marburg/Lahn

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 28. November 1966
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med., Dr. med. dent. habil. H. Heuser
Referent: Prof. Dr. med. Walter Schmid
Correferent: Doz. Dr. med. H. W. Kunz



Lebenslauf

Lebenslauf

Lebenslauf

1. Geburtsname und Geburtsdatum

2. Geburtsort und Geburtsort

3. Eltern

4. Ausbildung

5. Beruf

6. Familie

7. Hobbies

8. Sonstiges

9. Auszeichnungen

10. Sonstiges

11. Sonstiges

12. Sonstiges

Meinen Eltern

13. Geburtsname und Geburtsdatum

14. Geburtsort und Geburtsort

15. Eltern

16. Ausbildung

17. Beruf

18. Familie

19. Hobbies

20. Sonstiges

21. Auszeichnungen

22. Sonstiges

23. Sonstiges

24. Sonstiges

25. Sonstiges

26. Sonstiges

27. Sonstiges



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Experimenteller Teil	
I Wachstum und Sprossung kleiner Zellen mit Vitaminen und Persantinzugabe	
Methode	
1) Gewinnung kleiner Zellen	2
2) Versuchsanordnung	4
3) Nährmilieu	4
4) Bestimmung von Sprossung und Wachstum	6
Ergebnisse	
1) Zusatz von Vitaminen	7
2) Alter der Hefezellen	7
3) pH - Abhängigkeit	7
4) Einfluß von Persantin [®]	8
II Bestimmung von Wachstum, Sprossung, Protein, RNS, DNS und freien Nucleotiden an kleinen Zellen	
Methode	
1) Nährmedium	10
2) Versuchsanordnung	10
3) Bestimmung der freien Nucleotide	12
4) Bestimmung der Gesamtnucleinsäuren	13
5) Bestimmung der DNS	14
6) Bestimmung von Protein	14
7) Sprossung und Zellwachstum	15
Ergebnisse	
1) Normalversuche	
a) Wachstumsphase	15
b) Vermehrungsphase	15
2) Einwirkung von arseniger Säure	19

III Chromatographische Trennung von Perchlorsäure- extrakten aus synchronisierter Hefe

Methode

- | | |
|--|----|
| 1) Gewinnung des Extraktes | 21 |
| 2) Apparatur zur chromatographischen
Trennung | 22 |
| 3) Identifizierung einzelner Fraktionen | 23 |

Ergebnisse

- | | |
|---|----|
| 1) Untersuchungen am Vorlauf | 25 |
| 2) Nucleotide | 26 |
| 3) Quantitative Beziehungen im
Versuchsverlauf | 27 |

Diskussion	29
------------	----

Zusammenfassung	32
-----------------	----

Einleitung

Im Lebenszyklus von Einzellern kann die Vergrößerung, d.h. das Wachstum einer Einzelzelle vom Vorgang ihrer Vermehrung getrennt werden. Dies ist, wie eine Reihe von Untersuchungen gezeigt hat, auch bei Bäckerhefe möglich. Nun sind aber in einer Groß- oder auch Kleinkultur gewonnene Präparationen ein Kollektiv der verschiedensten Entwicklungsstadien. Wenn man übersichtliche Verhältnisse haben möchte, ist es daher notwendig, aus einer solchen Population möglichst einheitliche, d.h. möglichst gleich große Zellen zu gewinnen. Dies kann durch fraktioniertes Zentrifugieren erfolgen. In einer gleichzeitig laufenden Untersuchung gewann G. Jacobi¹⁾ große Zellen, die sich durch eine rasche Vermehrung durch Sprossung und eine synchronisierte DNS-Synthese auszeichneten.

In der vorliegenden Arbeit sollten möglichst kleine Zellen untersucht werden. Das Ziel war, Synthesevorgänge, vor allem von Protein, Nucleinsäuren und Zellwachstum, zu erfassen und zu prüfen, ob sich dabei die Möglichkeit ergibt, die Vermehrungsphase von der Wachstumsphase abzusetzen.

I Beeinflussung von Wachstum und Sprossung kleiner Zellen durch Vitamine und Dipyridamol (Persantin^R).

Methode

1) Gewinnung kleiner Zellen:

Als Ausgangsmaterial wurde käufliche Bäckerhefe der Firma MOORMANN Werne/Lippe verwendet, bei welcher es sich nach den Angaben des Herstellers um einen einheitlichen Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* handelt. Um möglichst frische und damit wachstums- und sprossungsfähige Zellen zu erhalten, wurde diese am Tage der Lieferung an den Großhandel sofort weiterverarbeitet oder bei uns bei maximal 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Über die Lagerzeiten bei der Herstellerfirma war uns nichts bekannt.

Die verschieden großen Sedimentationsgeschwindigkeiten von großen und kleinen Zellen konnten benutzt werden, sie voneinander zu trennen. Vorausgesetzt, daß große und kleine Zellen annähernd kugelige Gestalt besitzen und keine größeren Unterschiede ihrer Dichte aufweisen, ergibt sich für die Sedimentationsgeschwindigkeit v unter Anwendung des Stokesschen Reibungsgesetzes

$$v = \frac{g \cdot r^2 \cdot 2 \cdot \rho}{9 \cdot \eta} ,$$

wobei g die auf das Teilchen wirksame Beschleunigung, r der Teilchendurchmesser, ρ die Dichte des Teilchens und η die Viskosität der Suspensionsflüssigkeit ist. Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist also proportional dem Quadrat des Teilchenradius, d.h., daß große Zellen schneller sedimentieren als kleine.

Die Verarbeitung der frischen Hefe wurde nach vielen Vorversuchen folgendermaßen vorgenommen: ca. 400g Frischhefe wurden in 2,5 l physiologischer Kochsalzlösung durch Anreiben in einer Reibschale suspendiert. Diese Zellsuspension wurde unter Umrühren auf große Stockzentrifugengläser verteilt und zunächst 2 Minuten bei 250 x g in der großen Stockzentrifuge zentrifugiert. Nach vorsichtigem Herausnehmen der Gläser zeigte sich im oberen Drittel eine leicht getrübe Schicht I, die sich von einer undurchsichtigen mittleren Schicht II abgetrennt hatte. Außerdem befand sich am Boden des Glases eine Schicht sedimentierter Zellen. Schicht I

wurde mit einer Pipette abgesaugt und verworfen, da sie neben sehr kleinen Zellen (ca. 2 μ) auch mehr oder weniger große Mengen von Bakterien enthielt. Schicht II wurde vom Sediment abgossen und mit physiologischer Kochsalzlösung bis zum Ausgangsvolumen aufgefüllt und anschließend 30 Sekunden auf Stufe 1 (max. 250 x g) und weitere 30 Sekunden auf Stufe 2 (max. 1050 x g) zentrifugiert. Wiederum entstand eine Dreischichtung. Schicht I, zugleich die größte, wurde verworfen. Schicht II wurde wiederum entnommen und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 2,5 l aufgefüllt. Der Bodensatz wurde verworfen. Nach Umrühren wurde wiederum 120 Sekunden mit 250 x g zentrifugiert. Es zeigte sich nun über dem Sediment eine fast homogene Suspension, die leicht opaleszierte. Diese Suspension wurde dekantiert und danach wurde jedes Zentrifugenglas noch einmal mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt und das Sediment gut aufgerührt. Ein nochmaliges Zentrifugieren bei 250 x g während 2 Minuten lieferte wieder im Überstand eine leicht opaleszierende Schicht. Der Überstand wurde zu dem vorigen gegeben und dann bei 1900 x g 5 Minuten lang zentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen, das Sediment wurde mit wenig phys. Kochsalzlösung aufgenommen und als Suspension bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Gesamtmenge an Sediment betrug 5 - 7 g (Ausgangsmenge 400 g). Die Hefezellen eines solchen Sedimentes zeigten unter dem Mikroskop eine recht einheitliche Größe, wobei nicht nur größere Zellen, sondern auch kleinste vollständig fehlten. Auch Bakterien konnten nicht festgestellt werden. Ein weiteres Kriterium lieferte auch der Anteil der sprossentragenden Zellen, der in der nicht zentrifugierten Hefe 6 - 8%, in der zentrifugierten 0 - 1% betrug.

Um die Zellgrößenverteilung und die mittlere Zellgröße zu erfassen, wurde einerseits im CELLOSCOPE der Fa. AB LARS LJUNGBERG u. Co., Stockholm, eine Price - Jones - Kurve einer Zellsuspension aufgestellt, andererseits im Okularschraubenmikrometer der Fa. ZEISS der Durchmesser von 50 Zellen bestimmt (s. Tab. 1). Damit konnte gleichzeitig eine Eichung des CELLOSCOPES in diesem Meßbereich durchgeführt werden. Die Messung im Okularschraubenmikrometer erfolgte bei 800 - facher Vergrößerung. Die Differenz der beiden gemessenen Zahlenwerte (Randbegrenzungen der Zellen) mußte mit dem Faktor 0,8 multipliziert werden, um den wahren Durchmesser

der gemessenen Zelle zu erhalten (der Faktor ergibt sich aus der Wahl des Okulars und der des Objektivs). Das arithmetische Mittel aus den 50 Zelldurchmessern lag fast genau bei $4\text{ }\mu$. Im CELLOSCOPE zeigte sich eine sehr ähnliche Verteilung bei Benutzung der Kapillare 1 und Grobeinstellung 60. Weiterdrehen der Feineinstellung um 10 entsprach dann einer Durchmesseränderung von $0,5\text{ }\mu$ (s. Abb. 1).

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, aus einer Zellverteilung, die zwischen 2 und $12\text{ }\mu$ im Zelldurchmesser bei der käuflichen Bäckerhefe schwankt, Zellen auszusondern, von denen über 90% einen Durchmesser zwischen 3 und $5\text{ }\mu$ haben. Der mittlere Durchmesser liegt bei $4\text{ }\mu$. Sämtliche Versuche wurden mit diesen Zellen ausgeführt. Vergleichsweise haben die von Jacobi¹⁾ gewonnenen Zellen einen mittleren Durchmesser von $5,5 - 6\text{ }\mu$.

2) Versuchsanordnung:

Zu einem Versuch wurden die suspendierten Zellen abzentrifugiert und vom Sediment eine Spatelspitze in ein großes Stockzentrifugenglas gegeben, mit 100 ml Nährsalzlösung versetzt, gut umgerührt und sofort in ein thermostatisch geregeltes Wasserbad gegeben, dessen Temperatur zwischen 25 und 30°C eingestellt wurde. Zur Verminderung einer Wasserabdunstung aus dem Versuchsgefäß wurde ein Stopfen mit 2 Durchbohrungen aufgesetzt. Eine Bohrung blieb offen, durch die andere führte ein Glasröhrchen bis zum Boden des Gefäßes und durchperlte die Nährlösung samt den suspendierten Zellen mit Luft, welche eine Membranpumpe durch eine Waschflasche mit Fritte leitete. Dadurch wurde eine Wasserdampfsättigung der Luft bei der Versuchstemperatur erreicht. Gleichzeitig wurde ein aerobes Milieu und eine gleichmäßige Verteilung der suspendierten Zellen geschaffen.

3) Das Nährmedium:

Als Nährlösung wurde eine Modifikation der Salzlösung nach Wickerham²⁾ verwandt, welche unter anderem Spurenelemente enthält. In einigen Versuchen wurden Vitamine in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Außerdem wurde soviel Glucose zugegeben, daß jeweils eine 4%ige Lösung entstand.

Zusammensetzung der Nährlösung:

Spurenelemente:

H_3BO_3	500 γ /Liter
Cu	40 γ /Liter
Fe	100 γ /Liter
Mn	400 γ /Liter
Mo	200 γ /Liter
Zn	400 γ /Liter

Salze:

KH_2PO_4	4,0 g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	2,0 g
NaCl	0,4 g
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,4 g
$(NH_4)_2SO_4$	4,0 g

Vitamine:

Biotin	2 γ /Liter
Folsäure	2 γ /Liter
Paraaminobenzoesäure	200 γ /Liter
Riboflavin	200 γ /Liter
Panthothensäure	400 γ /Liter
Inosit	2000 γ /Liter
Niacin	400 γ /Liter
Thiamin	400 γ /Liter
Pyridoxal	200 γ /Liter

Bei Versuchen, bei denen ein Dinatriumhydrogenphosphat - Zitronensäure - Puffer zugegeben wurde, setzte sich die Salzlösung folgendermaßen zusammen:

Pufferlösung:	200 ml
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	2,0 g
KCl	2,2 g
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,4 g
$(NH_4)_2SO_4$	4,0 g

Pufferlösung, Salze, Glucose (40 g) und Spurenelemente wurden mit aqua demin. auf 1000 ml aufgefüllt. Die Pufferlösung setzte sich je nach gewähltem Ausgangs - pH verschieden zusammen. Als Ausgangslösungen wurden

A. 0,1 m Citronensäure (21 g $C_6H_8O_7 \times 1 H_2O$ / Liter)

B. 0,2 m Dinatriumhydrogenphosphat (35,6 g $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ / Liter)

verwandt. Nach der Gleichung

$$x \text{ ml A} + (100-x) \text{ ml B} = \text{Pufferlösung}$$

wurde je nach gewünschtem pH der Puffer zusammengesetzt:

pH	2,6	2,8	3,0	3,2	3,4	3,6
x (ml)	89,1	84,15	79,45	75,3	71,5	67,8

pH	3,8	4,0	4,6	4,8	5,0
x (ml)	64,5	61,45	53,25	50,7	48,5

4) Bestimmung von Sprossung und Wachstum:

Die Bestimmung der Sprossung wurde so vorgenommen, daß bei mittlerer Vergrößerung (1:40) 100 Zellen unter dem Mikroskop in einer Thoma-Zählkammer durchgemustert und der prozentuale Anteil der Zellen mit Sprossen ermittelt wurde.

Mit dem CELLOSCOPE wurde zu verschiedenen Zeiten eine Price-Jones-Kurve aufgestellt. Dadurch konnte die Verschiebung der mittleren Zellgröße und damit das Wachstum der Zellen bestimmt werden, da nach der mit Hilfe des Okularschraubenmikrometers von ZEISS vorgenommenen Eichung eine Änderung der Feineinstellung um 10 eine Durchmesseränderung von $0,5 \mu$ entspricht. Für jede Messung im CELLOSCOPE wurde die Nährlösung samt Zellen 1:8000-fach verdünnt. Die auf dem Zählwerk abgelesene Zahl muß dann mit 1000 multipliziert werden, um die Zellzahl/mm³ in der Originalflüssigkeit zu erhalten. Nähere Einzelheiten über die Arbeitsweise des CELLOSCOPES siehe Diss. von G. Arnold³⁾.

Ergebnisse

Die Versuche wurden mit der im methodischen Teil beschriebenen Salzlösung und dem dort angegebenen Citronensäure-Phosphat-Puffer durchgeführt. Bei einer Zelldichte von 20 - 40 000 Zellen/mm³ war während der ersten 90 - 100 Minuten praktisch nur Zellwachstum vorhanden. Bis zu diesem Zeitpunkt vergrößerte sich der mittlere Zelldurchmesser von 4μ auf etwa $5,5 \mu$. Erst nachdem die Zellen diese durchschnittliche Größe erreicht hatten, begann die Sprossung. Sie erreichte innerhalb von 3 - 4 Std. ihr Maximum.

1) Zusatz von Vitaminen:

Diese Versuche wurden mit 4 - 7 Tage alten, kleinen synchronisierten Zellen durchgeführt und ein im methodischen Teil beschriebener Puffer zugesetzt, der bei pH 4,4 pufferte und in der Nährlösung 0,03 m vorlag. Aus 4 Versuchen, die mit reiner Salzlösung ohne Vitamine ausgeführt wurden, konnte im Vergleich zu 5 Versuchen mit Vitaminzusatz festgestellt werden, daß das Wachstum gleich lang und stark, jedoch der Sprossungsanstieg in Vitaminlösung wesentlich steiler war, und zwar lag die maximale Sprossung in Salzlösung bei $21\% \pm 1,5\%$, mit Vitaminen bei $51\% \pm 1,7\%$. Nach 6 Versuchsstunden war der mittlere Zelldurchmesser mit Vitaminzusatz um $1,5 \mu$ größer als in reiner Salzlösung. Dies darf zum Teil auf die stärkere Sprossung in Vitaminlösung zurückgeführt werden, da eine sprossentragende Zelle vom CELLOSCOPE als eine entsprechend große Zelle gezählt wird.

2) Alter der Hefezellen:

Versuche mit verschieden alter Hefe, d.h. nach erfolgter Synchronisation verschieden lang im Kühlschrank gelagerter Zellen, führten zu folgendem Ergebnis: 2 Wochen alte Hefe erreichte mit Vitaminen nur eine Sprossung von 12% (frische Hefe 51%), 3 Wochen gelagerte eine maximale Sprossung von 23%. Der mittlere Zelldurchmesser war nach 5-stündigem Versuch bei 3 Wochen alter Hefe um $0,5 \mu$ größer als bei 14 Tage alter Hefe. Dieser Unterschied beruht wohl auf der stärkeren Sprossung.

3) Abhängigkeit vom pH:

Zur Stabilisierung des Anfangs-pH wurde der oben erwähnte Citronensäure-Phosphat-Puffer zugesetzt. Die Konzentration betrug bei den beschriebenen Versuchen 0,03 m, das pH war 4,4. Am Versuchsende (ca. 8 Stunden nach Versuchsbeginn) war das pH mit Vitaminzusatz auf 2,6, in Salzlösung auf 2,8 abgesunken. Wurde keine Glucose zugesetzt, so fand kein messbares Wachstum und keine Sprossung statt. Entsprechend hatte sich das pH nach 8 Stunden ebenfalls nicht verändert, da keine Stoffwechselaktivität vorhanden war.

Wurde die Pufferkonzentration von 0,03 auf 0,06 m erhöht, so trat bei pH 4,4 mit Vitaminzusatz eine Sprossungshemmung von mehr

als 50 %, in reiner Salzlösung von mehr als 70% ein. Das pH war nach 11 Versuchsstunden mit Vitaminzusatz nur auf 3,1 , in Salzlösung auf 3,7 abgesunken.

Erhöhte man das Anfangs-pH auf 4,9 bei einer Pufferkonzentration von 0,03 m, so wurde mit Vitaminzusatz Sprossung und Wachstum nicht meßbar gegenüber den Versuchen bei pH 4,4 beeinflusst. Nach 9 Versuchsstunden war das pH der Nährlösung auf 3,1 abgesunken. In Salzlösung war die Sprossung bei einem Anfangs-pH von 4,9 um etwa 20% niedriger als bei pH 4,4. Nach 10 Versuchsstunden lag es bei 3,3.

Wurde bei einem Ausgangs-pH von 2,9 eine Pufferkonzentration von 0,06 m gewählt, so wuchsen und sprosseten die Zellen in Salz- und Vitaminlösung ebenso gut wie in den beschriebenen Versuchen bei pH 4,4 bei 0,03 m Pufferkonzentration. Das pH lag nach 10 Versuchsstunden mit Vitaminen bei 2,6 , in reiner Salzlösung bei 2,7. Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß ein Ausgangs-pH von 4,4 - 2,9 für wachsende Hefezellen in Bezug auf Wachstum und Sprossung gleich gute Bedingungen liefert. Erhöht man jedoch das pH auf 4,9 , so läßt sich in reiner Salzlösung eine deutliche Sprossungshemmung erkennen. Verdoppelung der Pufferkonzentration und damit Verringerung der pH-Verschiebung zeigte bei pH 4,4 eine starke Sprossungshemmung, während sie bei pH 2,9 keinen nennenswerten Einfluß hatte.

4) Einfluß von Persantin[®]:

In vorausgegangenen Versuchen von A. Wegner⁵⁾ wurde beobachtet, daß das Pyrimido-Pyrimidinderivat Persantin[®] Wachstum und Vermehrung gegenüber Versuchen in Salzlösung ohne Vitaminzusatz fördert. Dieser Befund veranlaßte eine weitere Nachprüfung.

Aus 5 Versuchen, die mit Persantin^R in einer Konzentration von 10^{-4} g/ml durchgeführt wurden, zeigte sich, daß das Wachstum nicht meßbar gegenüber der Kontrolle gefördert wurde, jedoch die Sprossung ein Maximum von $31\% \pm 2,5\%$ erreichte und damit die maximale Sprossung der Kontrolle von $21\% \pm 1,5\%$ übertraf. Der Zeitpunkt des Sprossungsbeginnes und des Maximums der Sprossung war gegenüber den Kontrollen nicht verschoben. Versuche, die mit einem Ausgangs-pH von 5,2 und 4,9 ausgeführt wurden, zeigten gegenüber den Versuchen bei pH 4,4 eine starke Sprossungshemmung. Das erreichte Maximum lag bei 5%. Der Sprossungsverlauf der Kontrolle war von dem

mit Persantinzusatz nicht zu unterscheiden.

Die sprossungsfördernde Wirkung des Persantins[®] scheint also an einen bestimmten pH-Bereich des Nährmediums gebunden zu sein, welcher zwischen 4,4 und 2,6 liegen muß, da zu Ende der Versuche mit Persantin[®] dieses pH erreicht wurde.

II Bestimmung von Wachstum, Sprossung, Bildung von Protein, RNS, DNS und freien Nucleotiden an kleinen Zellen.

Methode

1) Das Nährmedium:

Alle Versuche wurden mit einer Nährsalzlösung ausgeführt, die einer Arbeit von Williamson, D.H. und A.W. Scopes⁴⁾ entnommen wurde. Sie enthielt:

Glucose x H ₂ O	0,170	M = 34,00 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,015	M = 1,98 g	
KCl	0,010	M = 0,74 g	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,0025	M = 0,51 g	Mit aqua demin. auf 1000 ml aufgefüllt.
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,0024	M = 0,35 g	
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	0,380	M = 27,20 g	
Citronens. x H ₂ O	0,120	M = 5,04 g	

Sie enthielt also unter anderem einen Citronensäure - Phosphat - Puffer, der bei pH 5,8 puffert. Die entgültige Nährlösung enthielt diese Salzlösung mit einem Zusatz von 10% Hefekochsaft, der die Sprossungsfähigkeit und das Wachstum der Hefezellen erheblich steigerte. Der Hefekochsaft wurde bereitet, indem 200 g Frischhefe mit 300 ml aqua demin. in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben suspendiert und 15 Minuten bei 100°C gehalten wurde. Anschließend wurde 30 Minuten bei 1900 x g zentrifugiert und der klare, gelbe Überstand abgegossen. Dieser wurde bis zur weiteren Verwendung in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt.

2) Versuchsanordnung:

Für jeden Versuch wurden kleine Hefezellen nach der im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Methode benutzt. 1 g Sediment wurde zu 150 ml Nährlösung gegeben und gut durchmischt. Diese Zellsuspension entspricht einer 0,66%igen Hefekonzentration oder einer Zelldichte von etwa 115 000/mm³, da im CELLOSCOPE bei 1:8 000-facher Verdünnung durchschnittlich 115 Impulse bei einem Zählvorgang gezählt wurden. Diese Zellkonzentration war notwendig, um für die chemischen Bestimmungen ausreichende Mengen/Abnahme zu erhalten;

Nach 2-3-stündigem Versuchsverlauf trat jedoch Selbsthemmung der Vermehrung und Synthesevorgänge ein, da das Nährmilieu sich veränderte (s. Diss. A. Wegner⁵⁾). Dieser Selbsthemmung wurde dadurch begegnet, daß der Versuch nach 2 Stunden für wenige Minuten unterbrochen wurde, und in dieser Zeit die Nährlösung von den Zellen durch Zentrifugieren abgetrennt wurde, das verbrauchte Nährmilieu entfernt und zellkonzentrationsgerecht, d.h. unter Berücksichtigung der vorher entnommenen Mengen, neue Nährlösung zugesetzt wurde. So konnte mit kleinen Zellen dieser Konzentration eine 65 bis 70%ige Sprossung erzielt werden, die ohne diese Maßnahme auch nach längerem Zuwarten bei maximal 30% stehenblieb (s. Tab. 2 und Abb. 1).

Einfluss einer Nährmilieuerneuerung nach 2 h auf den Verlauf von Sprossung und RNS

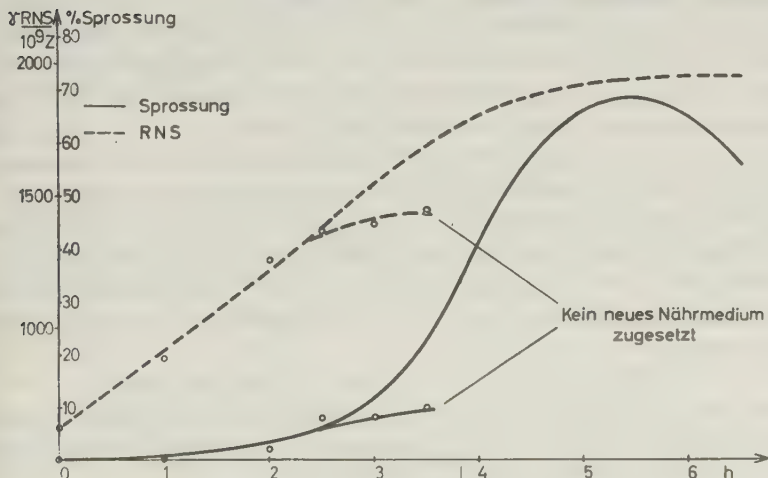


Abb. 1: Verlauf von Sprossung und RNS-Synthese mit und ohne
erneuerung des Nährmilieus.

Der Versuch gestaltete sich so, daß 1 g Hefesediment zu 150 ml Nährlösung gegeben und nach Umrühren in einem Wasserbad von 30°C inkubiert wurde. Außerdem wurde die Suspension mittels einer Membranpumpe belüftet und die Luft vorher mit Wasserdampf gesättigt. In bestimmten Zeitabständen wurden nun Abnahmen à 10 ml (= 0,06 g eingewogene Hefe) entnommen und diese in kleine Christ-Zentrifugengläser pipettiert, welche in einem Methanolbad von - 30 bis - 40°C standen. Abkühlung auf 0°C erfolgte so innerhalb einer Minute, wenn die Gläser vorgekühlt wurden.

3) Bestimmung der freien Nucleotide:

Nach vollständigem Einfrieren der Hefesuspension wurde bei 15°C im Wasserbad aufgetaut und in einer Christ-Zentrifuge bei 0° - 1°C 30 Minuten mit 3 500 x g zentrifugiert. Nach Abgießen der Nährlösung wurde der Bodensatz mit 5 ml 6%iger, kalter Perchlorsäure aufgenommen. Dann wurde bei 0°C auf dem Magnetrührer 30 Minuten extrahiert, wiederum 30 Minuten mit 3 500 x g in der Kälte zentrifugiert und der klare Überstand, der unter anderem die freien Nucleotide enthält (H. Schmitz⁶⁾), bei 260 m μ im ZEISS PMQ II gemessen. Zur Messung wurde der Extrakt 1:3 verdünnt (mit aqua demin.). Die Umrechnung auf μ Mol Nucleotid/10⁹ Zellen wurde so vorgenommen, daß in einem Versuch von allen Abnahmen die Perchlorsäureextrakte bei 260 m μ gemessen und mit der Orcinreaktion nach Meybaum⁷⁾ Pentosebestimmungen durchgeführt wurden. Aus einer aufgestellten Riboseeichkurve ergab sich, daß 0,792 μ Mol Ribose pro Meßansatz von 4 ml einer Extinktion von 1,0 entsprach. Da zu dieser Bestimmung 0,2 ml von je 5 ml Gesamtextrakt verwandt wurde, ist also:

$$\text{Ext.} \times 0,792 \times 25 = \mu \text{ Mol Ribose/Abnahme.}$$

Die bei 260 m μ gemessene Extinktion wurde auf Extinktion/Gesamtextrakt umgerechnet, indem die 1:3-fache Verdünnung berücksichtigt wurde. Da außerdem 5 ml Extrakt vorlagen, ist also:

$$\text{Ext. (260 m}\mu\text{)} \times 3 \times 5 = \text{Ext./Abnahme.}$$

Da 1 Mol Nucleotid 1 Mol Ribose enthält, gilt:

$$\frac{\text{Ext. 260 m}\mu\text{/Abnahme}}{\mu \text{ Mol Ribose/Abnahme}} = \frac{\text{Extinktion}}{1 \mu \text{ Mol Nucleotid}}$$

Dieser Extinktionskoeffizient wurde bestimmt, indem aus 6 Quotienten eines Versuches der Mittelwert gebildet wurde, der 4,45 betrug

Das heißt, daß sich bei einer Extinktion von 4,45 in 1 ml dieser Lösung 1 μ Mol Nucleotid befindet. Um die μ Mol Nucleotid/ 10^9 Zellen zu erhalten, mußte berücksichtigt werden, daß 1mm³ des Versuchsansatzes durchschnittlich $1,15 \times 10^5$ Zellen enthielt (s. oben). Da 1 Abnahme 10 ml betrug, ist also:

$$\frac{\text{Ext.} \times 15 \times 10^9}{4,45 \times 1,15 \times 10^5 \times 10^4} = \frac{\text{Ext.} \times 15}{4,45 \times 1,15} = \mu \text{ Mol Nucleotid}/10^9 \text{ Zellen.}$$

4) Bestimmung der Gesamtnucleinsäuren:

Das Sediment der vorangegangenen Extraktion wurde mit 5 ml Äther - Alkohol (1:3) gut umgerührt und 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen, um die Fette zu extrahieren. Anschließend wurde 15 Minuten bei 3 500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zentrifugat wurde nach Zugabe von 2 ml 6%iger Perchlorsäure gut verrührt, 15 Minuten bei 100°C hydrolysiert und im Wasserbad von ca. 15°C abgekühlt. Nach 30-minütigem Zentrifugieren bei 3 500 x g wurde der Überstand abgegossen und zur Bestimmung der Gesamtnucleinsäuren und der DNS verwandt.

Mit der Orcinprobe nach Barrensheen und Peham⁸⁾ wurden die Gesamtnucleotide bestimmt und zwar wurden

- 0,2 ml Extrakt
- 1,8 ml aqua demin. und
- 2,0 ml Orcinreagens

10 Minuten im Wasserbad bei 100°C gehalten und sofort auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde im ZEISS PMQ II bei 660 m μ die Extinktion gemessen, Schichtlänge 1 cm. Aus einer Riboseeichkurve ergab sich der Faktor 0,79, d.h. Ext. = 1 entspricht 0,79 μ Mol Ribose. Bei einem mittleren Molekulargewicht eines Oxymononucleotides (Purin/Pyrimidin = 1:1) von 370, entspricht, da ein Nucleotid eine Ribose enthält, die Extinktion 1 = $370 \times 0,79 = 292 \gamma$ Gesamtnucleinsäure/Ansatz. Da für einen Ansatz 0,2 ml Extrakt verwandt wurden, der Gesamtextrakt aber 2 ml betrug, geht für die Gesamtmenge an Nucleinsäure/Abnahme der Faktor 10 ein. Um die Nucleinsäure von 10^9 Zellen zu bestimmen, muß außerdem mit

$$\frac{10^9}{1,15 \times 10^9} \text{ multipliziert werden. Daraus folgt:}$$

$$\frac{\text{Ext.} \times 292 \times 10 \times 10^9}{1,15 \times 10^5 \times 10^4} = \gamma \text{ Gesamtnucleinsäuren}/10^9 \text{ Zellen.}$$

5) Bestimmung der DNS:

Zur DNS-Bestimmung wurden nach Dische⁹⁾

1 ml Extrakt und

2 ml Diphenylaminreagens

zusammengegeben und 10 Minuten bei 100°C im Wasserbad erhitzt, anschließend sofort auf Raumtemperatur abgekühlt und bei 600 m/μ, Schichtlänge 1 cm, im ZEISS PMQ II gemessen. Nach einer aufgestellten Eichkurve mit Desoxyadenosin entsprach einer Extinktion von 1 235 γ Desoxyadenosin/Ansatz oder, da das Molekulargewicht von Desoxyadenosin 268 ist, 0,877 μ Mol. Bei einem mittleren Molekulargewicht der Desoxynucleotide (Purin/Pyrimidin = 1:1) von 355 ergibt sich für Extinktion 1 = 355 × 0,877 = 312 γ Desoxynucleinsäure. Da zur Bestimmung von einem Gesamtextrakt von 2 ml nur 1 ml benutzt wurde, geht der Faktor 2 ein. Will man auf 10⁹ Zellen beziehen, so muß außerdem mit 1:1,15 multipliziert werden (s. oben). Also:

$$\frac{\text{Ext.} \times 312 \times 2}{1,15} = \gamma \text{ Desoxynucleinsäure}/10^9 \text{ Zellen.}$$

6) Bestimmung des Proteingehaltes:

Sie wurde nach der Biuretmethode¹⁰⁾ durchgeführt. Das Zentrifugat wurde mit 5 ml 0,1 n NaOH aufgenommen, um die restliche Perchlorsäure zu neutralisieren, und mit einem Magnetrührer homogenisiert.

1 ml Extrakt

4 ml physiol. Kochsalzlösung und

5 ml Biuretreagens

wurden 30 Minuten auf dem Magnetrührer gerührt, 20 Minuten bei 1900 × g in Spitzgläsern zentrifugiert und der klare Überstand im ZEISS PMQ II bei 546 m/μ, Schichtlänge 2 cm, gemessen. Es wird angegeben, daß einer Extinktion von 1 eine Proteinmenge von 16,5 mg/Ansatz entspricht. Da nur 1/5 des Gesamtextraktes für die Messung benutzt wurde, und der Proteingehalt von 10⁹ Zellen bestimmt werden soll, ergibt sich:

$$\frac{\text{Ext.} \times 16,5 \times 5}{1,15} = \text{mg Protein}/10^9 \text{ Zellen.}$$

7) Sprossung und Zellwachstum:

Gesamtzellzahl, Zellwachstum und Sprossung wurden, wie im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben, bestimmt (s. dort).

Ergebnisse

1) Normalversuche:

Aus 7 Versuchen wurde während 6 Stunden in halbstündigem bzw. viertelstündigem Abstand jeweils gleichzeitig Zellwachstum, Sprossung, Protein, RNS, DNS und freie Nucleotide bestimmt (in Tab. 6 Durchschnittswerte aus 7 Versuchen). Die Veränderungen dieser verschiedenen Meßgrößen wurden zueinander in Beziehung gesetzt, um eventuelle Abhängigkeiten und Gesetzmäßigkeiten im Ablauf zu erkennen. Zur Definition von Wachstum und Vermehrung s. Diss. A. Wegner⁵⁾.

a) Wachstumsphase:

Während der ersten beiden Versuchsstunden vergrößerten sich die Zellen, deren Ausgangsgröße zu über 90% zwischen 3 und 5 μ lag, auf einen mittleren Zelldurchmesser von 5,5 bis 6,0 μ (s. Abb. 2 und Tab. 3 und 4). Zu diesem Zeitpunkt war der prozentuale Anteil der sprossentragenden Zellen noch unter 5%. Die DNS vermehrte sich nur um $8\% \pm 4\%$, die RNS um fast 100% und Protein um 45%. Die freien Nucleotide stiegen um 200% an. Die Verlaufskurven während dieser Phase waren annähernd Geraden (s. Tab. 6 und Abb. 3, 4 und 5).

b) Vermehrungsphase:

Der Beginn der sich anschließenden Vermehrungsphase war gekennzeichnet durch einen steilen Anstieg der Sprossung und der freien Nucleotide sowie durch eine allerdings weniger rasche Zunahme der DNS. Nach Beginn der Vermehrungsphase nahm sie im Verlaufe von 4 Stunden um ca. 100% zu. Zum Zeitpunkt der 50%igen DNS-Vermehrung war der Anteil der sprossentragenden Zellen bereits 10%, also nur noch etwa 10% unter dem erreichten Sprossungsmaximum von 70%. Dies zeigte, daß die Sprossung der DNS-Vermehrung

Zellgrößenverteilung

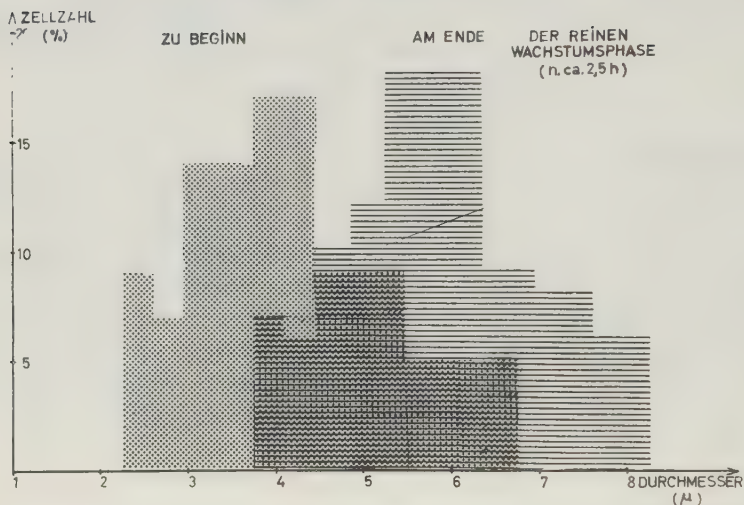


Abb. 2: Verteilung der Zellgrößen zu Beginn des Versuches und am Ende der Wachstumsphase.

vorausging. Der mittlere Zelldurchmesser war 4 Stunden nach Vermehrungsbeginn auf ca. 7,5 μ angestiegen (s. Tab. 5).

Dem abrupten Anstieg der freien Nucleotide von mehr als 100% innerhalb einer halben Stunde folgte etwa eine Stunde nach dem Maximum ein Abfall gleicher Größe. Die DNS hatte sich zu diesem Zeitpunkt erst um ca. 40% vermehrt, die Sprossung war ebenfalls auf 40% angestiegen.

In den ersten 2 Stunden der Vermehrungsphase stiegen die Verlaufskurven von Protein und RNS weiter geradlinig an, während nach 6 Versuchsstunden sowohl die Verlaufskurven von Protein und RNS als auch die von DNS und freien Nucleotiden sich sämtlich asymptotisch an eine Parallele zur Zeitachse annäherten. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich die DNS verdoppelt, Protein und RNS waren auf das Dreifache ihres Ausgangswertes angestiegen. Die Sprossung

begann abzufallen.

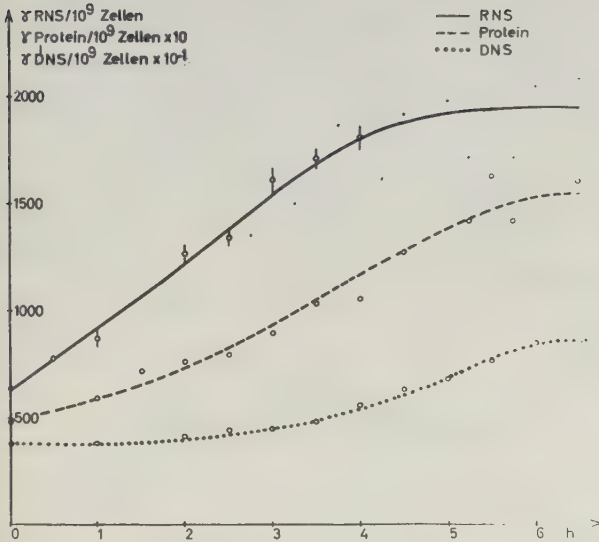


Abb. 3: Verlauf von RNS, DNS und Protein.

• • • = Mittelwerte aus 2 bis 3 Einzelwerten.

† † † † = Streubreite des Mittelwertes.

Um einen Maßstab für das Verhältnis von RNS- zu DNS-Konzentration während Wachstum und Vermehrung zu erhalten, wurde der Quotient RNS/DNS gebildet. In den ersten beiden Versuchsstunden stieg dieser fast linear von 17 auf 35 an, da die RNS ebenfalls geradlinig zunahm und die DNS sich praktisch nicht vermehrte (s. Abb. 4).

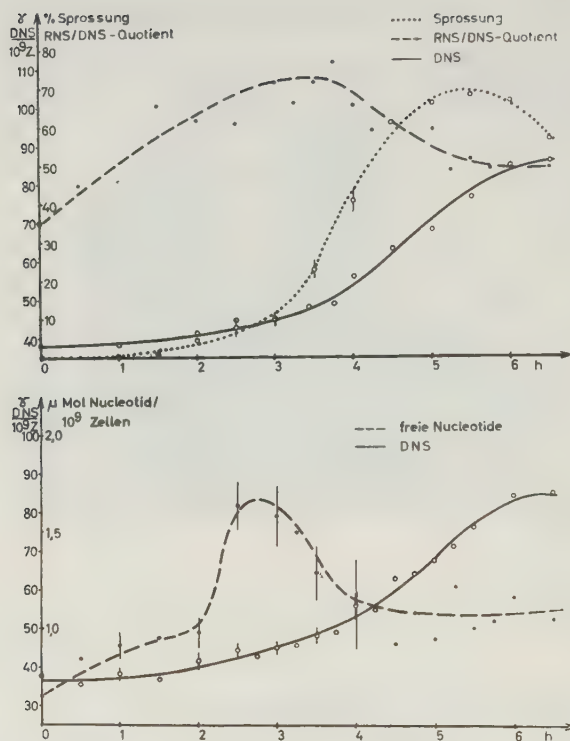


Abb. 4: Sprossungsverlauf, DNS-Synthese und RNS/DNS-Quotient.
(Die Werte des RNS/DNS-Quotienten sind mit 0,5 zu multiplizieren).

Abb. 5: Verlauf der freien Nucleotide und der DNS-Synthese.

II Verhalten von Sprossung, RNS, DNS, Protein, Zellwachstum und freien Nucleotiden bei Zusatz von arseniger Säure:

Arsenige Säure ist eine cytotoxische Substanz, die die Atmung von Hefezellen schon in einer Konzentration von 10^{-6} g/ml hemmt und die Gärung fördert (Meier, R., W. Schuler und R. Krueger¹⁶). In einem Versuch wurde K_2AsO_3 in einer Konzentration von 10^{-5} g/ml zugesetzt. Während die Kontrolle im Verlauf den Normalversuchen völlig entsprach, war mit K_2AsO_3 -Zusatz nach 6 Stunden die Sprossung nur auf 15% (Kontrolle 64%) angestiegen, RNS um 40%, DNS um 45%, Protein um 43% gegenüber der Kontrolle gehemmt (s. Tab. 7 und Abb. 6).

Hemmung von Sprossung, RNS- und DNS-Synthese durch K_2AsO_3 -Einwirkung.

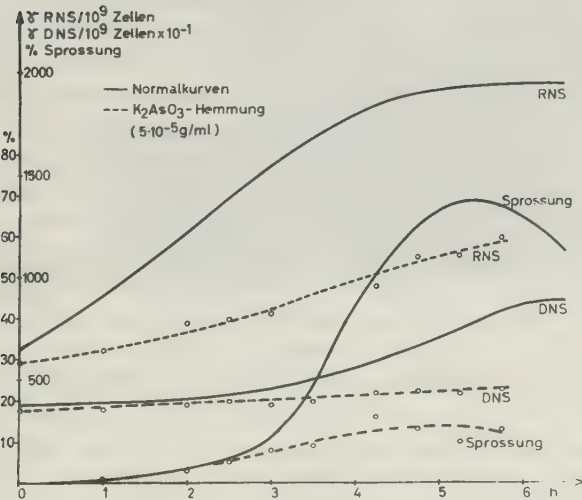


Abb. 6: Einwirkung von arseniger Säure.

Die freien Nucleotide zeigten dagegen im Gesamtverlauf keine nennenswerte Abweichung gegenüber der Kontrolle.

Über die Zellgrößenverteilung nach 5-stündigem Versuchsverlauf gibt Abb. 7 und Tab. 8 Auskunft. Fast die Hälfte aller Zellen blieb klein, ein Teil war zu großen, sprossentragenden Zellen herangewachsen.

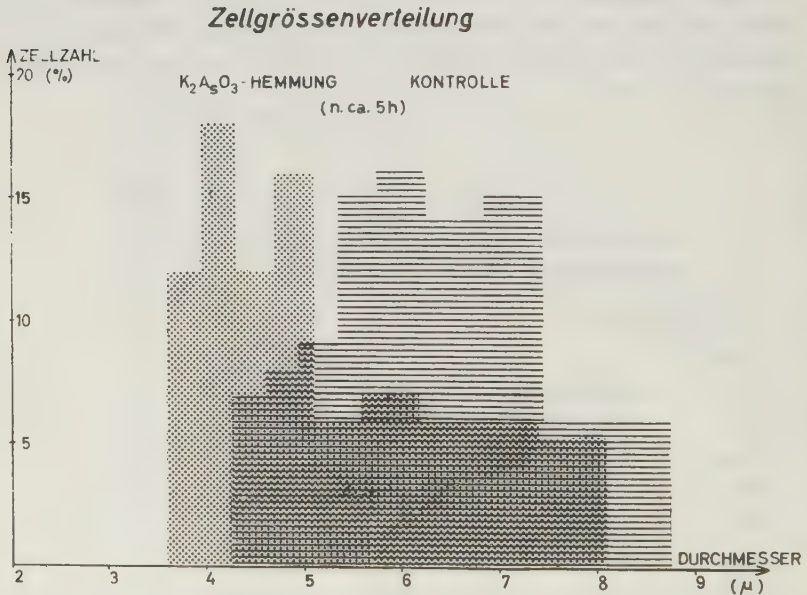


Abb. 7: Einwirkung von arseniger Säure auf das Zellwachstum.

III Chromatographische Trennung von Substanzen aus Extrakten, die mit kalter, 6%iger Perchlorsäure aus Hefe extrahiert wurden.

Methode

Zur Klärung des Phänomens, daß vor Sprossungsbeginn ein starker Anstieg der "säurelöslichen Fraktion" und nach demselben ein Abfall der bei $260\text{ m}\mu$ gemessenen Extinktion erfolgt, wurde eine chromatographische Trennung versucht, da unter anderem, wie H. Schmitz⁶⁾ zeigte, freie Nucleotide in größerer Menge darin enthalten sind. Nach einer Reihe von Vorversuchen, welche Kühlung der Austauschersäule, Gradientenverlauf bei der Elution, Durchflußgeschwindigkeit, Säulenkapazität und Absolutmenge des Extraktes zum Gegenstand hatten, wurden die Versuche folgendermaßen durchgeführt:

1) Die Gewinnung des Extraktes:

In einem Vorversuch wurden, wie bei den oben beschriebenen Versuchen, zu verschiedenen Zeiten Abnahmen à 10 ml aus dem Versuchsansatz entnommen und die "freien Nucleotide" im Zeiss-Photometer bei $260\text{ m}\mu$ bestimmt. Dadurch konnte der Zeitpunkt des Extinktionsmaximums und des darauf folgenden Extinktionsabfalles für jeden Versuch festgelegt werden, da von Hefebezug zu Hefebezug Unterschiede festzustellen waren. Für jede Abnahme wurden 60 ml Nährlösung, entsprechend 0,46 g Hefezentrifugat zu Beginn des Versuches, in große Christ-Zentrifugengläser pipettiert, innerhalb weniger Minuten im Methanolbad bei -40°C eingefroren, vorsichtig im Wasserbad von 15°C aufgetaut und mit $3\ 500 \times g$ bei 0° bis 1°C zentrifugiert, die Nährlösung abgegossen, der Bodensatz mit 60 ml eiskaltem aqua demin. aufgerührt und nochmals abzentrifugiert, um Reste der Nährlösung zu beseitigen (sonst unnötiges Beladen der Austauschersäule mit Phosphat aus der Nährlösung). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zentrifugat mit 30 ml eiskalter 6%iger Perchlorsäure eine halbe Stunde auf dem Magnetrührer extrahiert und anschließend bei 0°C und $3\ 500 \times g$ zentrifugiert. Der klare Überstand wurde im Methanolbad von minus 5°C mit kalter 3 n KOH

auf pH 7 neutralisiert, wobei das Perchlorat-Ion als KClO_4 ausfiel. Dann wurde das ausgefallene KClO_4 vom Extrakt abzentrifugiert, und der Extrakt bis zur weiteren Verwendung in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

2) Apparatur zur chromatographischen Trennung von Nucleotiden nach der von Hurlbert, Schmitz, Brumm, Potter und Madison¹¹⁾ ausgearbeiteten Methode:

Ein Polyäthylenschlauch (Länge 135 cm, Querschnitt 28 mm^2) wurde mit dem Anionenaustauscherharz DOWEX (1 x 8), mesh 200-400, Gegenion HCOO^- (Fa. SERVA) beschickt und vertikal fixiert. Mit einer "Bühler" Fingerpumpe wurde über einen PVC-Schlauch von $1 \text{ mm } \varnothing$ die Elutionsflüssigkeit aus einem geschlossenen Mischgefäß von 200 ml Mischvolumen auf die Säule gepumpt. Ein quaderförmiges Gradientengefäß (5 x 9 x 20) mit diagonal verlaufender Trennwand bildete zwei Zulaufe, die durch ein dünnes Glas-T-Stück verbunden wurden. Aus der dritten Öffnung des T-Stückes führte ein Verbindungsschlauch zum Mischgefäß, das 200 ml aqua demin. enthielt.

Als Elutionsmittel wurde ein Ammoniumformiat-Ameisensäure-Puffer verwendet, der aus gleichen Teilen einer

20,0 m HCOOH und

3,75 m NH_3 -Lösung

bestand und ein pH von 2,4 aufwies. Zur Elution wurde in das sich nach unten verjüngende Zulaufgefäß 1:10 verdünnter Puffer gegeben und dieser bis zu einem Volumen von 32 ml in das Mischgefäß fließen lassen, wobei die Pufferkonzentration im Mischgefäß nach der Gleichung:

$$c = c_1 \left(1 - e^{-\frac{V}{V_0}}\right)$$

anstieg. V_0 ist das Mischgefäßvolumen, c_1 die Konzentration im Zulaufgefäß und V die zugeflossene Puffermenge (nach E. Geiss¹²⁾). Dann wurde auf zwei Zulaufgefäße umgesetzt, indem das sich nach unten verbreiternde Gefäß, welches mit konzentriertem Puffer gefüllt war, zugeschaltet wurde. Die unterschiedliche Dichte der verschiedenen Pufferkonzentrationen mußte für die jeweilige Einfüllhöhe berücksichtigt werden. Der Gradient stieg dann etwas steiler als linear an, was für die Elution der Triphosphate günstig war. Mit diesem kontinuierlichen Gradienten konnte eine geringe Anfangskonzentration und eine später rasch ansteigende Konzentration er-

zielt werden. Am unteren Ende der Austauschersäule gelangten die eluierten Substanzen über einen dünnen PVC-Schlauch in eine Durchflußküvette von 1 cm Schichlänge, Im ZEISS PMQ II wurde so die Extinktionsänderung bei $260 \text{ m}\mu$, Spalt 0,1 mm gemessen, und nach Zwischenschaltung eines ZEISS TEW die Konzentrationsänderungen mit einem Metrawatt-Schreiber linear aufgezeichnet. Die Elutionsgeschwindigkeit sowie die Geschwindigkeit des Auftragens betrug $11,5 \text{ mm}^3 \times \text{mm}^{-2} \times \text{min.}^{-1}$.

Nach dem Auftragen des Extraktes auf die Säule wurden mit aqua demin. zunächst alle mit Wasser eluierbaren Substanzen ausgewaschen und aufgefangen. Dann wurde der Puffergradient angeschlossen und einzelne Fraktionen aufgefangen. Die große Auftragsmenge (ca. 38 ml) verhinderte eine Trennung des mit Wasser eluierten Vorlaufes, welcher daher nach Einengung auf 1 bis 2 ml im Rotationsverdampfer ("Büchi") bei maximal 30°C rechromatographiert wurde. Wiederum wurde mit aqua demin. eluiert. Vier Vorlauf-Fraktionen konnten auf diese Weise voneinander getrennt werden.

3) Identifizierung einzelner Fraktionen:

Die mit Puffer eluierten Fraktionen konnten nach Einengung im Rotationsverdampfer "Büchi" bei 25° bis 30°C nicht ohne weiteres mittels Dünnschichtchromatographie identifiziert werden, da Ammoniumformiat aus dem Elutionspuffer sich ebenfalls anreicherte und die R_f -Werte stark beeinträchtigte. Versuche, durch Aufnahme von UV-Absorptionsspektren eine Charakterisierung durchzuführen, konnten ebenfalls keine befriedigenden Ergebnisse bringen, da Ammoniumformiat im kurzwelligeren UV eine Eigenabsorption aufweist. Eine Kationenaustauschersäule, die mit Ionenaustauscher I von MERCK beschickt wurde, konnte zwar dazu benutzt werden, die NH_4^+ -Ionen weitgehend zu entfernen, jedoch waren die eluierten Substanzmengen so gering, daß sie nach dieser Behandlung und nachfolgender Einengung weder spektrophotometrisch noch dünnschichtchromatographisch nachweisbar waren. Die planimetrische Auswertung der aufgezeichneten Konzentrationsänderungen ließ quantitative Aussagen über die Zusammensetzung der Extrakte im Versuchsablauf zu.

An den mit aqua demin. eluierten Vorlauffraktionen wurden nach Einengung mit dem Rotationsverdampfer folgende Untersuchungen durchgeführt:

- a) Aufnahme von UV-Absorptionsspektren, Bestimmung von Ext. 250
und Ext. 280 , Absorptionsmaximum und -minimum bei bestimmten
Ext. 260 pH in wässriger Lösung.
- b) Pentosebestimmung (teils quantitativ, teils qualitativ) mit der
Orcinprobe nach Barrensheer und Pellam⁸⁾.
- c) Desoxyribosebestimmung mit der Diphenylaminreaktion nach Dische⁹
- d) Phosphatbestimmung nach Fiske - Subbarrow¹³⁾.
- e) Abtrennung der Basen von Nucleosiden nach Marshak und Vogel¹⁴⁾.
Nach der Hydrolyse wurde mit KOH neutralisiert, das ausgefalle-
ne KClO_4 in der Kälte abzentrifugiert und das eingeeengte
Hydrolysat zur dünn-schichtchromatographischen Trennung ver-
wendet.
- f) Dünn-schichtchromatographie von eingeeengten Fraktionen und Hydro-
lysaten auf ECTEOLA - Platten und MN 300-Zelluloseplatten.
Fließmittel aqua demin..
- g) Da eiweiß- und aminosäurehaltige Fraktionen vorhanden waren,
wurde auf Kieselgelplatten (Laufmittel 70% Äthanol und 30%
aqua demin.) eine Trennung versucht. Sichtbarmachung mit Nin-
hydrin-Sprühareagens. Cystinnachweis nach Chargaff, Lerene und
Green¹⁵⁾. Eine Hydrolyse der eiweißhaltigen Fraktionen wurde
nicht ausgeführt.
- h) Zuckernachweis mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Sprühareagens.

Ergebnisse

Die chromatographische Trennung der mit kalter 6%iger Perchlorsäure extrahierten Substanzen zeigte, daß ein Teil des Gesamtextraktes keinen ausgesprochenen Anionencharakter besaß, da er den Ionenaustauscher passierte und mit aqua demin. eluiert werden konnte. Dieser Vorlauf konnte nach Einengung und Rechromatographie in 4 Fraktionen zerlegt werden. Von jeder einzelnen wurde zunächst ein UV-Spektrum aufgenommen (s. Tab. 9).

1) Untersuchungen am Vorlauf:

Die erste Fraktion des Vorlaufes (V_1) hatte folgende Merkmale ihres Spektrums: Maximum bei 259 m μ , Minimum bei 244 m μ ,

$$\frac{\text{Ext. 250}}{\text{Ext. 260}} = 0,91, \quad \frac{\text{Ext. 280}}{\text{Ext. 260}} = 0,33.$$

Die Reaktion auf Phosphat war ebenso wie die auf Desoxyribose negativ, die auf Pentose deutlich positiv. Dünnschichtchromatographisch zeigte sich auf Kieselgel, daß Aminosäuren und möglicherweise Oligopeptide in größerer Menge vorlagen. Nach dem R_f -Wert könnte u.a. Tyrosin enthalten sein. Der Cystinnachweis war positiv. Da diese beiden Aminosäuren im UV absorbieren, kann ein Teil der UV-Absorption dieser Fraktion auf diese Aminosäuren zurückgeführt werden. Außerdem deutet der positive Pentosenachweis auf das gleichzeitige Vorhandensein eines Ribosids hin. Es wurde nicht näher identifiziert. Der Zuckernachweis mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Sprühreagens war negativ.

Die zweite Vorlauffraktion (V_2) war im UV-Spektrum charakterisiert durch: Maximum bei 261 m μ , Minimum bei 238 m μ ,

$$\frac{\text{Ext. 250}}{\text{Ext. 260}} = 0,92, \quad \frac{\text{Ext. 280}}{\text{Ext. 260}} = 0,59.$$

Nach Trennung auf Dünnschicht (ECTEOLA) mit aqua demin. als Fließmittel lag V_2 in einer Höhe mit Uridin und Cytidin. Auf einer Kieselgelplatte konnten Aminosäuren nachgewiesen werden, die im einzelnen nicht identifiziert wurden. Der Pentosenachweis war positiv. Phosphat war negativ. Eine Identifizierung des möglicherweise vorhandenen Ribosids wurde nicht durchgeführt.

Das UV-Spektrum von V_3 zeigte, (pH 3,8):

Maximum 260 m/μ, Minimum 234 m/μ,

$\frac{\text{Ext. 250}}{\text{Ext. 260}} = 0,84$, $\frac{\text{Ext. 280}}{\text{Ext. 260}} = 0,38$. Diesem Spektrum kommt das des

Uridins (pH 2) nahe: Maximum 262 m/μ, Minimum 230 m/μ,

$\frac{\text{Ext. 250}}{\text{Ext. 260}} = 0,74$, $\frac{\text{Ext. 280}}{\text{Ext. 260}} = 0,35$. Der Pentosenachweis war positiv,

der Phosphatnachweis negativ. Nach Trennung auf MN 300 befand sich V_3 auf der Höhe von Uridin und Thymin und war einheitlich. Die Ninhydrinreaktion war negativ. Damit lag nahe, daß V_3 überwiegend aus Uridin bestand.

Charakterisierung des UV-Spektrums von V_4 :

Maximum 248,5 m/μ, Minimum 223 m/μ,

$\frac{\text{Ext. 250}}{\text{Ext. 260}} = 1,52$, $\frac{\text{Ext. 280}}{\text{Ext. 260}} = 0,25$ (bei pH 4,5). Damit stimmt es in

Minimum, Maximum und dem Quotienten $\frac{\text{Ext. 280}}{\text{Ext. 260}}$ (bei pH 3) exakt mit dem Nucleosid Inosin überein. Für den Quotienten $\frac{\text{Ext. 250}}{\text{Ext. 260}}$ wird 1,68 angegeben. Der Pentosenachweis war positiv. Auf 1 Mol von V_4 entfiel 0,61 Mol Pentose, wenn man für Inosin einen millimolaren Extinktionskoeffizienten von 12,2 zugrunde legt. Dies deutete darauf hin, daß ein Teil der Fraktion als freie Base, also als Hypoxanthin, vorlag. Nach Trennung auf ECTEOLA spaltete sich V_4 in 2 Flecke auf, einen schwächeren auf der Höhe von Hypoxanthin und einen stärkeren auf der Höhe von Inosin. Um zu zeigen, daß V_4 nur eine Base enthielt, wurde eine Hydrolyse nach Marshak und Vogel ¹⁴⁾ durchgeführt. Eine nachfolgende Trennung auf ECTEOLA zeigte, daß nur eine Nucleobase vorlag und diese auf der Höhe des Hypoxanthins lag. Die Ninhydrinreaktion war negativ, ebenso der Phosphatnachweis.

2) Nucleotide:

Versuche, die Nucleotidfraktionen zu identifizieren, scheiterten daran, daß die Substanzmenge nach Passieren eines Kationenaustauschers zur Entfernung des Ammoniumformiats nicht ausreichten, ein UV-Spektrum aufzunehmen oder mittels Dünnschichtchromatographie eine Identifizierung durchzuführen. Es wurde deshalb versucht, eine quantitative Auswertung der einzelnen Fraktionen vorzunehmen und im Versuchsverlauf zu verfolgen.

3) Quantitative Beziehungen von Vorlauf- und Nucleotidfraktionen zueinander während des Versuches:

Von sämtlichen Fraktionen, einschließlich Vorlauffraktionen, wurden die Mengen (Extinktion x Volumen) planimetrisch bestimmt. Aus einem Versuch wurden 3 Abnahmen entnommen: 1 Stunde vor dem Extinktionsmaximum bei 260 m μ , (I), im Maximum (II), und 1,5 Stunden nach dem Maximum (III). Die hieraus hergestellten Extrakte wurden in 1:3-facher Verdünnung bei 260 m μ gemessen und die Extinktionen bestimmt: Ext. I = 0,192, Ext. II = 0,630, Ext. III = 0,445. Die aufgetragenen Extraktvolumina zur Säulenchromatographie waren bei allen 3 Abnahmen gleich.

Es ergaben sich bei der chromatographischen Trennung die in Tab. 10 und Abb. 8 dargestellten Verhältnisse.

Zusammensetzung von säurelöslichen Hefeextrakten zu verschiedenen Zeitpunkten eines Versuches

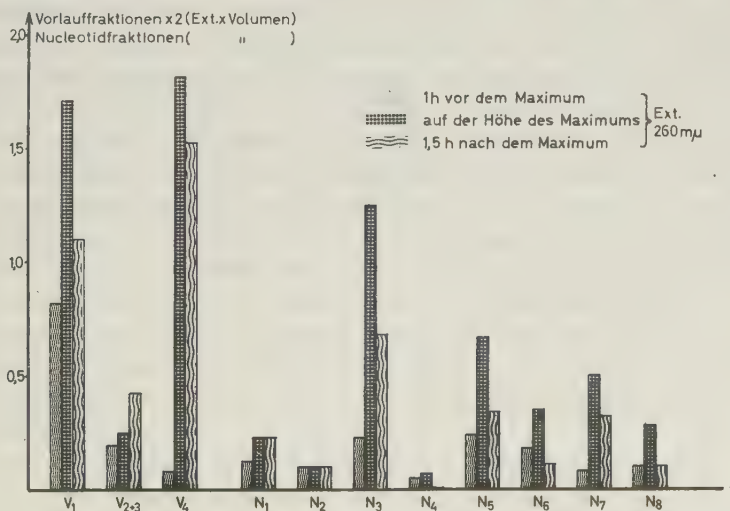


Abb. 8: Verhalten der Vorlauffraktionen und der Nucleotidfraktionen im Versuchsverlauf.

Der Quotient Gesamtvorlauf/Gesamtnucleotiden war für I = 1,99 , für II = 2,19 , für III = 3,24 . Die Extinktionszunahme von I auf II, die einer Verdreifachung des Wertes I entsprach, betraf also die Vorläufe und die Nucleotide fast im gleichen Maße, da der Quotient von I und von II ziemlich genau bei 2 lag. Allerdings traten Verschiebungen zwischen den einzelnen Fraktionen auf, z. B. die relative Zunahme des Inosins in I ca. 7%, in II fast 50% des Gesamtvorlaufes. Die Abnahme III hatte gegenüber der Abnahme II eine Extinktionsabnahme von etwa 30%. Die Vorlauffraktionen entsprachen in ihrem Verhältnis zueinander etwa dem der Abnahme II, wenn sie auch absolut gesehen etwas niedriger lagen. Dagegen war die Gesamtmenge der Nucleotide abgefallen, wie das oben erwähnte Verhältnis von Vorlauf zu Nucleotiden erkennen läßt. Im wesentlichen waren die Fraktionen N₃ bis N₈ betroffen.

Diskussion

Durch fraktionierte Zentrifugation ließ sich aus einer Mischpopulation verschieden großer Zellen von Bäckerhefe eine Fraktion gewinnen, deren Zellen einen Durchmesser von 3 - 5 μ hatten und die etwa in der Mitte der Größenskala der Ausgangszellverteilung lagen. Diese Zellgröße erwies sich als geeignet, die Wachstumsphase, d.h. die reine Vergrößerung der Zellen, über längere Zeit (bis zu 120 Minuten) zu verfolgen. Erst zu diesem Zeitpunkt begann mit Sprossung und Zunahme der DNS die Vermehrungsphase.

In einer ersten Versuchsreihe wurden frühere Ergebnisse an nicht fraktionierten Hefezellen nachgeprüft, nach denen Dipyridamol (Persantin[®]) die Vermehrung der Hefe steigern sollte (s. Diss. Wegner⁵). An der jetzt verwendeten Zellfraktion wurde eine Steigerung der Sprossungsgeschwindigkeit gefunden, während das Wachstum nicht beeinflusst wurde. Auch der Sprossungsbeginn war nicht verfrüht. Besonders bemerkenswert ist, daß diese Wirkung in reiner Salzlösung auftrat, wenn sie auch nicht die Größe von Vitamingemischen erreichte. Eine Erklärung für diese Wirkung des Dipyridamols ist schwer zu geben, allenfalls könnten die von Siess am Meerschweinchenherzvorhof erhobenen Befunde herangezogen werden, nach denen Dipyridamol die ATP-Synthese beschleunigt.

Der Hauptteil der Versuche befaßte sich mit der Untersuchung der Neubildung von Protein, Nucleinsäuren und freien Nucleotiden. In der Wachstumsphase setzte sehr rasch eine Neubildung von Ribonucleinsäure ein. Zu Ende der Wachstumsphase hatte sie sich etwa verdoppelt. Demgegenüber begann die Proteinbildung etwas später. Sie war längst nicht so stark wie die RNS-Synthese und hatte nach 2 Stunden erst um ca. 40% zugenommen. Die DNS veränderte sich in dieser Zeit praktisch nicht. Auch die säurelösliche, bei 260 m μ absorbierende Fraktion vermehrte sich in der Wachstumsphase um das Doppelte.

Von besonderem Interesse ist das Ausmaß der Vergrößerung der Zellen. Sie wuchsen nämlich auf einen durchschnittlichen Durchmesser von 5,5 μ heran, und rückten damit in die Größenklasse ein, bei der, wie in der Diss. G. Jacobi¹) berichtet wird, die Zellen synchron zu sprossen beginnen. Dem entspricht, daß auch die

RNS-Werte zu diesem Zeitpunkt denen der primär sproßbereiten großen Zellen entsprachen. Es ergibt sich also, daß die Hefezelle eine bestimmte Größe und RNS-Gehalt erreichen muß, bevor Sprossung und DNS-Synthese beginnen. Um ein weiteres Kriterium für die "Vermehrungsreife" zu finden, wurde der RNS/DNS-Quotient gebildet. Es zeigte sich, daß er am Ende der Wachstumsphase einem maximalen Wert zustrebt und dann wieder abfällt.

Mit dem Einsetzen der Vermehrungsphase, für die die DNS-Synthese sicher ein besseres Kriterium als das Einsetzen der Sprossung ist, ergeben sich bei den verschiedenen Substrat-Synthesen deutliche Veränderungen. Die RNS-Synthese wird langsamer und strebt einem Plateau zu, dagegen wird die Proteinsynthese steiler. Die DNS verdoppelt sich innerhalb 3 Stunden und hat dann ein neues Plateau erreicht. Mit dem Erreichen des Plateaus bleibt auch die Proteinsynthese stehen.

Einen auffallenden Verlauf zeigte die 260 m μ -Fraktion. Sie steigt zu Beginn der Vermehrungsphase innerhalb einer halben Stunde steil auf den doppelten Wert an und fällt dann beinahe ebenso steil wieder ab. Wenn man Verdoppelung der DNS und Erreichen eines neuen Plateaus als maßgeblich für Synchronisierung ansieht, so hat sich auch die verwendete Zellfraktion als synchronisiert erwiesen. Damit gewinnt auch die passagere Zunahme der säurelöslichen Fraktion besonderes Interesse, zumal sie am Anfang der Vermehrungsphase steht und der Abfall synchron mit einer verstärkten Zunahme der DNS und einem Abfall des RNS/DNS-Quotienten einhergeht. Ähnliche Verhältnisse wurden auch an den großen synchronisierten Zellen von Frau Jacobi gefunden. Um eine etwaige Beziehung zwischen Peak der säurelöslichen Fraktion zur DNS-Vermehrung herzustellen, mußte diese Fraktion analysiert werden. Wie zu erwarten, setzte sie sich nach Trennung auf einer Anionenaustauschersäule aus einer Vielzahl von Substanzen zusammen. Wenn auch die Identifizierung nur teilweise durchgeführt werden konnte, ergibt sich die deutlichste Beziehung zu Anstieg und Abfall in der Gruppe der Nucleotide. Es erscheint allerdings noch verfrüht, aus diesem Verhalten, vor allem in Bezug auf die in Gang befindliche DNS-Synthese, Schlüsse zu ziehen. Insgesamt sieht es aber so aus, als ob man zu Beginn der Vermehrung von einer bestimmten Konstellation bezüglich

RNS/DNS-Quotient und Anhäufung von Nucleotiden reden kann. Freilich muß auch die Möglichkeit diskutiert werden, daß es sich bei den säurelöslichen Nucleotiden um Fraktionen handelt, welche zu den niedermolekularen, aminosäuretragenden Nucleotiden gehören, wie sie von Harris¹⁷⁾ bei der Hefe gefunden wurden.

Ein erster Versuch, durch eine vermehrungshemmende Substanz wie arsenige Säure einen differenzierten Verlauf der geprüften Synthesekurven zu erhalten, erbrachte noch kein eindeutiges Ergebnis. Immerhin fällt auf, daß bei praktisch gehemmter DNS-Synthese der Peak der säurelöslichen Fraktion zwar auftritt, aber nur etwa die Hälfte der ungehemmten Kontrolle erreichte.

Natürlich muß bei dem Suchen nach den von uns diskutierten Beziehungen immer berücksichtigt werden, daß es sich vor allem bei der hier bestimmten RNS um einen vielgestaltigen und multifunktionellen Komplex handelt. Es muß also die weitere Aufgabe sein, noch weitere Differenzierungen durchzuführen.

Zusammenfassung

- 1) Durch fraktionierte Zentrifugation wurde aus Bäckerhefe eine Fraktion von einer mittleren Zellgröße von 3 bis 5 μ Durchmesser gewonnen.
- 2) Bei diesen Zellen ist eine Wachstumsphase (ca. 2 Stunden Dauer) von einer Vermehrungsphase deutlich zu trennen. Die Vermehrung erfolgt synchronisiert.
- 3) Am Ende der Wachstumsphase erreichen die Zellen eine Größe, die den ebenfalls durch fraktionierte Zentrifugation gewonnenen sofort sproßbereiten Zellen entspricht. In der Wachstumsphase wird bei gleichbleibender DNS-Konzentration Protein und RNS synthetisiert. Auch die freien Nucleotide nehmen zu. In den ersten 30 Minuten geht die RNS-Synthese der Proteinbildung voran.
- 4) Vor dem Einsetzen der Vermehrung kommt es zu einer kurzdauernden starken Zunahme der freien Nucleotide mit anschließendem Wiederabfallen. An dem Peak sind nach chromatographischer Trennung Mono-, Di- und Triphosphatnucleotide beteiligt.
- 5) Während der DNS-Bildung verläuft die RNS-Synthese abgeflacht, die Proteinsynthese geht indessen unverändert weiter.

Literaturverzeichnis:

- 1) Jacobi, G.:
Dissertation, Marburg 1966
- 2) Wickerham, L.J.:
Techn. Bulletin, Nr. 1029, Dep. of Agriculture Washington D.C.
Toxonomy Yeast
- 3) Arnold, G.:
Dissertation, Marburg 1963
- 4) Williamson, D.H. and A.W. Scopes:
Exptl. Cell Res. 20, 338 (1960)
- 5) Wegner, A.:
Dissertation, Marburg 1963
- 6) Schmitz, H.:
Bioch. Zeitschrift 325, 555 (1954)
- 7) Meybaum, W.:
Hoppe - Seyler, Zeitschrift für Phys. Chemie 258, 117 (1939)
- 8) Barrensheen, K.K. and A. Peham:
J. Phys. Chem. 272, 81 (1942)
- 9) Dische, Z.:
Mikrochemie, 8.4.1930
- 10) Weichselbaum, T.E.:
Amer. J. Clin. Path. (Techn. Sec.) 10, 40 (1946)
- 11) Hurlbert, R.B., H. Schmitz, H. Brumm, R. v. Potter, Madison:
J. Biol. Chem. 209, 23 (1954)

- 12) Geiß, E.:
Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere,
Tübingen 5.1.1957
- 13) Fiske, C.H. und Subbarrow, Y.:
J. Biol. Chem. 66, 375 (1925)
- 14) Marshak, A. and H.J. Vogel:
J. Biol. Chem. 189, 579 (1951)
- 15) Chargaff, E., C. Levine and Green:
J. Biol. Chem. 175, 67 (1948)
- 16) Meier, R., W. Schuler und R. Krueger:
Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie 224, 206
- 17) Harris, G. and G.E. Neal:
Bioch. Biophys. Acta (Amsterdam) 47, 122 - 129 (1961)

Tabellen

Tab. 1: Größenverteilung von 50 synchronisierten Zellen, die im ZEISS - Okularschraubenmikrometer gemessen wurden.

<u>Durchm. (μ)</u>	<u>2,5-3,0</u>	<u>3,0-3,5</u>	<u>3,5-4,0</u>	<u>4,0-4,5</u>	<u>4,5-5,0</u>	<u>5,0-5,5</u>
2,88	3,04	3,52	4,08	4,64	5,04	
-	3,20	3,52	4,08	4,64	5,04	
-	3,20	3,60	4,08	4,72	5,28	
-	3,28	3,60	4,16	4,80	-	
-	3,36	3,68	4,24	4,96	-	
-	3,44	3,68	4,24	-	-	
-	3,44	3,76	4,24	-	-	
-	3,44	3,76	4,32	-	-	
-	3,44	3,84	4,32	-	-	
-	3,44	3,84	4,32	-	-	
-	3,44	3,84	4,32	-	-	
-	3,44	3,92	4,32	-	-	
-	-	3,92	4,40	-	-	
-	-	3,92	4,40	-	-	
-	-	-	4,48	-	-	

Tab. 2: Einfluß einer Nährmilieuerneuerung nach 2 Versuchsstunden.

Die Zahlen geben die Mittelwerte aus 3 Versuchen wieder.

Minuten	0	60	120	150	180	210
Sprossung (%)	0	0	1	2	5	28
Spr. ohne neues Nährmilieu	0	0	2	8	8	10
RNS ($\gamma/10^9$ Zellen)	608	822	1368	1377	1643	1730
RNS ohne n. Nährm.	620	883	1254	1368	1392	1449
DNS ($\gamma/10^9$ Zellen)	40	42	39	45	51	48
DNS ohne n. Nährm.	40	42	39	44	50	48

Tab. 3: Zellgrößenverteilung zu Beginn der Versuche. Gemittelte Werte aus 5 Versuchen.

Feineinstellung (Diskr. 60)	20	27	34	42	50	60	72	84	97	110
arithm. Mittel der gezählt. Impulse	103	92	84	70	56	39	25	17	11	6
Zählflüssigkeit	6	4	3	2	2	1	1	1	0	0
Differenz	97	88	81	68	54	38	24	16	11	6
Zellen bezogen auf 100	100	91	84	70	56	39	25	16	11	6
Differenzen zwischen den Einstellungen	9	7	14	14	17	14	9	5	5	
Zelldurchmesser (μ)	2,5	-	-	-	4,5	-	-	-	-	6,5

Tab. 4: Zellgrößenverteilung nach 2,5 Versuchsstunden. Gemittelte Werte aus 2 Versuchen.

Feineinstellung (Diskr. 33)	20	27	34	42	50	60	72	84	97	110
gezählte Impulse	99	92	86	76	64	46	28	19	11	5
Differenzen zwischen den Feineinstellungen	7	6	10	12	18	18	9	8	6	
Zelldurchmesser (μ)	4,0	-	-	-	6,0	-	-	-	8,0	

Tab. 5: Zellgrößenverteilung nach 4 Versuchsstunden. Gemittelte Werte aus 2 Versuchen.

Feineinstellung (Diskr. 25)	20	27	34	42	50	60	72	84	97	110
gezählte Impulse	87	86	82	75	67	52	40	27	19	11
Zellen bezogen auf 100	100	99	94	86	77	60	46	31	22	13
Differenzen zwischen den Feineinstellungen	1	5	8	9	17	14	15	9	9	
Zelldurchmesser (μ)	5,0	-	-	-	7,0	-	-	-	9,0	

Tab. 6: Gemittelte Versuchsergebnisse aus 7 Normalversuchen. Die Streuung des Mittelwertes wurde zum Teil angegeben.

Minuten	0	60	90	120	150	180
Sprossung (%)	0 $\pm$ 0,0	0,28 $\pm$ 0,03	1,00	4,28 $\pm$ 1,2	7,70 $\pm$ 2,3	10,00 $\pm$ 1,9
Mittlerer Zelldurchmesser (μ)	4,0	—	—	—	6,0	—
Freie Nucleotide (μ Mol/ 10^9 Zellen)	0,60 $\pm$ 0,07	0,91	0,95	0,97 $\pm$ 0,08	1,63 $\pm$ 0,12	1,58 $\pm$ 0,16
Protein (mg/ 10^9 Zellen)	4,79	5,95	7,18	—	7,94	8,97
Ribonucleinsäure (γ / 10^9 Zellen)	655 $\pm$ 21	868 $\pm$ 41	1199	1268 $\pm$ 33	1339 $\pm$ 31	1608 $\pm$ 62
Desoxyribonucleins. (γ 10^9 Zellen)	38 $\pm$ 1	38 $\pm$ 1,5	37	41 $\pm$ 1,8	44 $\pm$ 1,5	45 $\pm$ 1,3
RNS / DNS - Quotient	17,5	22,8	32,5	30,7	30,2	35,7

Minuten	210	240	270	300	330	345	360	390
Sprossung	22,7 $\pm$ 2,1	40,3 $\pm$ 3,1	60,5	65,5	67,5	64,0	66,0	56,0
Mittlere Zelldurchmesser	—	7,5	—	—	—	—	—	—
Freie Nucleotide	1,28 $\pm$ 0,14	1,13 $\pm$ 0,24	0,92	0,94	1,00	1,04	1,16	1,05
Protein	10,31	10,51	12,72	14,12	16,20	14,12	16,20	16,00
Ribonucleinsäure	1705 $\pm$ 45	1864 $\pm$ 57	1912	1973	1939	1707	2041	2079
Desoxyribonucleinsäure	48 $\pm$ 2,2	56 $\pm$ 3,4	63,0	68,0	76,0	71,0	84,0	85,0
RNS / DNS - Quotient	35,5	32,5	30,3	29,3	25,5	24,2	24,2	24,4

Tab. 7: Hemmende Wirkung von arseniger Säure in einer Konzentration von 10^{-5} g/ml. Die Zahlen in Klammern geben die Differenz zur Kontrolle in % wieder. K = Kontrolle, As = K_2AsO_3 - Zusatz

Minuten	Sprossung (%)	Mittlerer Zelldurchmesser (μ)	Freie Nucleotide (μ Mol/10 ⁹ Zellen)	Protein (mg/10 ⁹ Zellen)	RNS (γ /10 ⁹ Zellen)	DNS (γ /10 ⁹ Zellen)
K 0	0 (0)	4,0	0,67	4,81	616	35
As 0	0 (0)	4,0 (0)	0,82 (+22)	4,44 (-8)	576 (-6)	36 (+3)
K 60	1	-	0,77	-	805	36
As 60	0 (-1)	-	1,01 (+31)	-	641 (-20)	36 (0)
K 120	4	-	0,96	7,61	1179	40
As 120	3 (-1)	-	1,00 (+4)	6,09 (-20)	778 (-34)	38 (-5)
K 155	10	6,0	1,93	-	1212	43
As 155	5 (-5)	5,0 (-17)	1,26 (-35)	-	795 (-34)	40 (-8)
K 180	13	-	1,94	-	1430	54
As 180	8 (-5)	-	1,47 (-24)	-	824 (-42)	38 (-30)
K 210	17	-	0,90	10,19	1559	47
As 210	9 (-8)	-	0,85 (-5)	6,53 (-36)	-	40 (-15)
K 255	48	-	0,95	-	1609	54
As 255	16 (-32)	-	1,13 (+19)	-	959 (-40)	44 (-19)
K 285	53	-	1,08	-	1638	64
As 285	13 (-40)	-	1,17 (+8)	-	1107 (-32)	45 (-31)
K 315	66	6,7	1,22	-	1709	71
As 315	10 (-56)	5,2 (-22)	1,34 (+10)	-	1110 (-35)	43 (-39)
K 345	64	-	1,04	14,12	1705	71
As 345	13 (-51)	-	1,40 (+35)	8,03 (-49)	1196 (-30)	46 (-35)

Tab. 8: Zellgrößenverteilung im Versuchsverlauf nach Zugabe von arseniger Säure.

Differenzen zwischen den Feineinstellungen	20	27	34	42	50	60	72	84	97	110
Ausgangsgröße (Diskr. 60) bezogen auf 100 Zellen	3	3	3	20	15	13	19	9	6	4
Zelldurchmesser in μ (Diskr. 60)	2,5	-	-	-	4,5	-	-	-	-	6,5
Nach 2,5 Versuchsstunden (Diskr. 33) Kontrolle	7	5	11	13	17	14	10	7	4	
Nach 2,5 Versuchsstunden (Diskr. 33) mit K_2AsO_3	19	22	13	12	12	5	5	4	3	
Zelldurchmesser in μ (Diskr. 33)	4,0	-	-	-	6,0	-	-	-	-	8,0
Nach 6 Versuchsstunden (Diskr. 33) mit K_2AsO_3	12	18	12	16	3	7	6	6	5	
Nach 6 Versuchsstunden (Diskr. 20) Kontrolle	7	8	9	15	16	14	15	6	6	
Zelldurchmesser in μ (Diskr. 20)	4,7	-	-	7	6,7	-	-	-	-	8,7

Tab. 9: UV-Absorptionsspektren der Vorlaufaktionen gemessen im ZEISS PMQ II

	m μ : max.	min.	250		280		210		215		220		222		225		230		232		235	
			260	260	260	260																
Ext. x 10 ³ (pH 5,5) V ₁	259	244	0,91	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-	1585	1110	639	-	-	-	-	-	417	-
Ext. x 10 ³ (pH 4,8) V ₂	261	239	0,92	0,59	725	413	-	-	572	413	-	-	-	292	220	206	191	-	-	-	-	-
Ext. x 10 ³ (pH 3,8) V ₃	260	233	0,84	0,38	1100	845	-	-	845	502	-	-	-	324	262	255	260	-	-	-	-	-
Ext. x 10 ³ (pH 4,5) V ₄	248,5	223	1,52	0,25	780	467	-	-	467	298	-	-	280	285	343	-	-	-	-	-	-	-

	m μ : 237	240	242	245	247	250	255	258	260	262	264	265
V ₁	370	325	313	312	320	339	366	379	378	372	-	356
V ₂	-	189	193	197	-	211	223	-	229	227	226	-
V ₃	273	298	-	359	-	426	482	503	505	502	495	-
V ₄	-	585	-	682	708	715	601	-	476	-	-	364

	m μ : 270	275	280	290	300	320	340
V ₁	291	203	123	53	37	20	13
V ₂	206	173	134	70	45	24	17
V ₃	411	304	192	56	36	27	23
V ₄	273	186	117	33	18	10	-

Tab. 10: Austauschchromatogramm von säurelöslichen Hefeextrakten im Versuchsverlauf.

V₁ bis V₄ = Vorlaufaktionen. N₁ bis N₈ = Nucleotidfraktionen. Die Zahlenwerte haben die Dimension Extinktion x Volumen und wurden planimetrisch gemessen.

Abnahme	E _{260m} /μ	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
		Aminosäuren unbekanntes Ribosid	Aminosäuren unbekanntes Ribosid	Uridin ?	Inosin Hypoxanthin
I	0,192	1,64	0,39		0,16
II	0,630	3,42	0,50		3,64
III	0,445	2,20	0,85		3,05

Abnahme	E _{260m} /μ	Vorlauf : Nucleotiden								nicht identifizierte Nucleotidfraktionen									
		N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	N ₅	N ₆	N ₇	N ₈										
I	0,192	2,19 : 1,10 = 1,99								0,12	0,10	0,23	0,05	0,24	0,18	0,08	0,10		
II	0,630	7,55 : 3,45 = 2,19								0,23	0,10	1,25	0,07	0,67	0,35	0,50	0,28		
III	0,445	6,10 : 1,88 = 3,24								0,23	0,10	0,68	-	0,34	0,11	0,32	0,10		

Lebenslauf

Am 28. 8. 1938 wurde ich als Sohn des kaufm. Angestellten Wilhelm Stosseck und seiner Frau Paula Stosseck, geb. Gutheil, in Marburg/Lahn geboren. 1944 zogen wir infolge Kriegseinwirkung nach Mölln/Krs. Marburg, wo ich im Herbst 1945 in die Volksschule Heskem eintrat. 1948 konnten wir unsere Wohnung in Marburg wieder beziehen, und ich absolvierte die Grundschule bis Ostern 1950 an der hiesigen Nordschule. 1950 bis 1959 besuchte ich die hiesige Martin - Luther - Schule und legte am 3. 3. 1959 die Reifeprüfung ab.

Mit dem Studium der Medizin begann ich im SS 1959 an der Philipps - Universität Marburg und bestand die Ärztliche Vorprüfung im Anschluß an das SS 1961. Die beiden ersten klinischen Semester belegte ich an der Universität Marburg. Das WS 1962/63 absolvierte ich in Wien und kehrte zum SS 1963 nach Marburg zurück. Am Ende dieses Semesters begann ich mit der vorliegenden Arbeit, die ich nach Beendigung des WS 1963/64 unterbrach. Im SS 1964 meldete ich mich zum Staatsexamen und beendete die Prüfung am 26. 2. 1965. Im Anschluß daran setzte ich meine Arbeit am Pharmakologischen Institut der Universität Marburg fort.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg: Amon, Bock, Braun-Falco, Bücher, Dimroth, Dölle, Eggstein, Exner, Gedigk, Golenhofen, Gross, Grüter, Hamm, Hartmann, Hensel, Hildebrant, Hornung, Huber, Jacob, Kaufmann, Kessler, Kottmeyer, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mahr, Marx, Maurath, du Mesnil, Müller, Niessing, Nieth, Oksche, Petry, Sauer, Schleyer, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schultze, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Stein, Stender, Streicher, Vogell, Vogt, Walcher, Waller, Wendt, Würterle.

in Wien: Burian, Fellingner, Fuchsig, Langer, Neuhold, Orel, Pillat.

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Schmid für seinen Rat und seine Hilfe bei der Abfassung der Arbeit sowie die Möglichkeit, die Einrichtungen des Institutes benutzen zu können , herzlich danken.

Herrn Doz. Dr. Kunz danke ich für die Übernahme des Correferates.

